

1/1/1

DI:LOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010199705 **Image available**

WPI Acc No: 1995-100959/199514

XRAM Acc No: C95-045788

Detection of polynucleotide, permitting amplified detection - using nucleic acid probe having sequence complementary with base sequence of specified portion of target polynucleotide and composed of ribonucleotide and labelled deoxyribonucleotide

Patent Assignee: HITACHI LTD (HITA)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 7023799	A	19950127	JP 93172863	A	19930713	199514 B

Priority Applications (No Type Date): JP 93172863 A 19930713

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 7023799	A		8	C12Q-001/68	

Abstract (Basic): JP 7023799 A

New detection of polynucleotides uses a nucleic acid probe having a sequence complementary with the base sequence of a specified portion of a target polynucleotide and composed of a ribonucleotide and a deoxyribonucleotide with at least one site of the deoxyribonucleotide bonded with a labelling substance. The probe is bonded to the target polynucleotide under hybridising conditions, which is reacted with an RNA-decomposing enzyme(s) and a nucleic-acid-synthesising enzyme(s) in the co-presence of at least one deoxyribonucleotide triphosphate and a dideoxynucleotide triphosphate having a base different from that of the deoxyribonucleotide triphosphate to elongate the 3' terminal by a specified length of the base. The resultant ribonucleotide portion is cut to obtain labelled deoxyribonucleotides of a specified length; and the target polynucleotide is detected from the amt. of the labelled deoxyribonucleotides produced.

ADVANTAGE - The method permits high-sensitivity detection of DNA through amplification. Introduction of two different fluorescent labels facilitates the detection further.

Dwg.0/5

Title Terms: DETECT; POLYNUCLEOTIDE; PERMIT; AMPLIFY; DETECT; NUCLEIC; ACID ; PROBE; SEQUENCE; COMPLEMENTARY; BASE; SEQUENCE; SPECIFIED; PORTION; TARGET; POLYNUCLEOTIDE; COMPOSE; RIBONUCLEOTIDE; LABEL

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12Q-001/68

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-E05; B11-C07B3; B11-C08E5; B12-K04F; D05-H09; D05-H12; D05-H18B

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M430 M782 M903 N102 P831 Q233 Q505 V753 V802 V810

02 M423 M750 M903 N102 Q233 V753

Chemical Fragment Codes (M6):

03 M903 P831 Q233 Q505 R514 R515 R521 R624 R625 R639

?

(19) 【発行国】 日本国特許庁 (JP)

(12) 【公報種別】 公開特許公報 (A)

(11) 【公開番号】 特開平 7-23799

(43) 【公開日】 平成 7 年 (1995) 1 月 27 日

(54) 【発明の名称】 ポリヌクレオチドの検出方法

(51) 【国際特許分類第 6 版】

C12Q 1/68 Z 9453-4B

【審査請求】 未請求

【請求項の数】 8

【出願形態】 OL

【全頁数】 8

(21) 【出願番号】 特願平 5-172863

(22) 【出願日】 平成 5 年 (1993) 7 月 13 日

(71) 【出願人】

【識別番号】 000005108

【氏名又は名称】 株式会社日立製作所

【住所又は居所】 東京都千代田区神田駿河台四丁目 6 番地

(72) 【発明者】

【氏名】 岡野 和宜

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪 1 丁目 280 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

(72) 【発明者】

【氏名】 神原 秀記

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪 1 丁目 280 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

(19) [Publication Office] Japanese Patent Office (JP)

(12) [Kind of Document] Japan Unexamined Patent Publication (A)

(11) [Publication Number of Unexamined Application (A)] Japan Unexamined Patent Publication Hei 7-23799

(43) [Publication Date of Unexamined Application] 1995 (1995) January 27 day

(54) [Title of Invention] DETECTION METHOD OF POLYNUCLEOTIDE

(51) [International Patent Classification 6th Edition]

C12Q 1/68 Z 9453-4B

[Request for Examination] Examination not requested

[Number of Claims] 8

[Form of Application] OL

[Number of Pages in Document] 8

(21) [Application Number] Japan Patent Application Hei 5-172863

(22) [Application Date] 1993 (1993) July 13 days

(71) [Applicant]

[Applicant Code] 000005108

[Name] HITACHI LTD. (DB 69-054-1503)

[Address] Tokyo Chiyoda-ku Kanda Surugadai 4-Chome 6

(72) [Inventor]

[Name] Okano Kazunobu

[Address] Inside of Tokyo Kokubunji City Higashi Koigakubo 1-Chome No.280 area Hitachi Ltd. (DB 69-054-1503) Central Research Laboratory

(72) [Inventor]

[Name] Kanbara Hideki

[Address] Inside of Tokyo Kokubunji City Higashi Koigakubo 1-Chome No.280 area Hitachi Ltd. (DB 69-054-1503) Central

(72) 【発明者】

【氏名】 川本 和子

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪 1 丁目 2 8 0
番地 株式会社日立製作所中央研究所内

(72) 【発明者】

【氏名】 古山 宏子

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪 1 丁目 2 8 0
番地 株式会社日立製作所中央研究所内

(74) 【代理人】

【弁理士】

(57) 【要約】

【構成】 核酸プローブにリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成されたものを用い、標的ポリヌクレオチドに結合させる。次に、少なくとも一種のデオキシリボヌクレオチド 3 リン酸とそれとは異なる塩基種のダイデオキシヌクレオチド 3 リン酸共存下で、RNA 分解酵素と核酸合成酵素を反応させることで 3' 末端を一定塩基長伸長させ、リボヌクレオチド部分を切断する。伸長分解したプローブは蛍光標識されていて、元の核酸プローブとはサイズが異なるので電気泳動で検出される。

【効果】 一定温度の反応で伸長分解したプローブとして

(72) [Inventor]

[Name] Kawamoto Kazuko

[Address] Inside of Tokyo Kokubunji City Higashi Koigakubo 1-Chome No.280 area Hitachi Ltd. (DB 69-054-1503) Central Research Laboratory

(72) [Inventor]

[Name] Furuyama Hiroko

[Address] Inside of Tokyo Kokubunji City Higashi Koigakubo 1-Chome No.280 area Hitachi Ltd. (DB 69-054-1503) Central Research Laboratory

(74) [Attorney(s) Representing All Applicants]

[Patent Attorney]

(57) [Abstract]

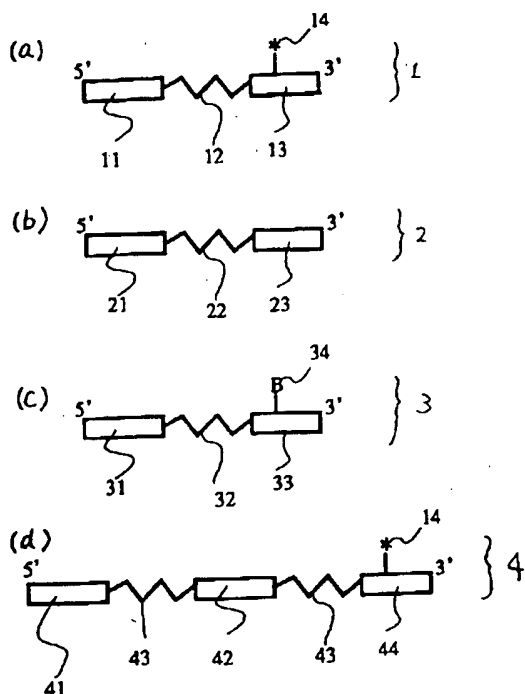
[Constitution] It connects to target polynucleotide making use of those which in nucleic acid probe consist ribonucleotide and deoxyribonucleotide. Next, deoxyribonucleotide 3 phosphoric acid of at least one kind and that under dideoxy nucleotide 3 phosphoric acid coexisting of the base kind which differs, RNA hydrolase and nucleic acid synthesis enzyme fixed base length extension doing 3' end by fact that it reacts, it cuts off ribonucleotide portion. Because extension as for probe which was disassembled fluorescent label being done, size differs from original nucleic acid probe, it is detected with the electrophoresis.

[Effect(s)] Amplifying it can detect extension was disassembled

増幅検出できる。

as probe which with reaction of constant temperature.

図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 標的となるポリヌクレオチドの特定部位の塩基配列と相補的な配列を有する核酸プローブがリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成されたもので、デオキシリボヌクレオチドの少なくとも一カ所に標識物が結合したものをを用い、核酸プローブを標的ポリヌクレオチドにハイブリッド形成条件下で結合させ、少なくとも一種のデオキシリボヌクレオチド 3 リン酸とデオキシリボヌクレオチド 3 リン酸とは異なる塩基種のダイデオキシヌクレオチド 3 リン酸の共存下で RNA 分解酵素と核酸合成酵素を反応させ、3' 末端を一定塩基長伸長させ、リボヌクレオチド部分を切断し、一定長になった標識デオキシリボヌクレオチドの生成量から標的ポリヌクレオチドの検出を行うことを特徴とするポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項 2】 標的となるポリヌクレオチドの特定部位の塩基配列と相補的な配列を有する核酸プローブがリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成されたもので、核酸プローブを標的ポリヌクレオチドにハイブリッド形成条件下で結合させ、少なくとも一種のデオキシリボヌクレオチド 3 リン酸とデオキシリボヌクレオチド 3 リン酸とは異なる塩基種の標識ダイデオキシヌクレオチド 3 リン酸の共存下で RNA 分解酵素と核酸合成酵素

[Claim(s)]

[Claim 1] Something where base sequence of specific site of polynucleotide which becomes target and nucleic acid probe which possesses complementary sequence consist theribonucleotide and dioxynucleotide being. Those which label connects at least to one site of dioxynucleotide touse, Connecting nucleic acid probe to target polynucleotide under hybridization condition, dioxynucleotide 3 phosphoric acid and thedioxynucleotide 3 phosphoric acid of at least one kind RNA hydrolase and nucleic acid synthesis enzyme reacting under coexistingof dideoxynucleotide 3 phosphoric acid of base kind which differs, fixed base length extension doingthe 3' end, detection method of polynucleotide which designates that it detects thetarget polynucleotide from produced amount of labelling dioxynucleotide which cuts off ribonucleotide portion, has become the constant length as feature.

[Claim 2] Something where base sequence of specific site of polynucleotide which becomes target and nucleic acid probe which possesses complementary sequence consist theribonucleotide and dioxynucleotide being. Connecting nucleic acid probe to target polynucleotide under hybridization condition, dioxynucleotide 3 phosphoric acid and thedioxynucleotide 3 phosphoric acid of at least one kind RNA hydrolase and nucleic acid synthesis enzyme reacting

を反応させ、3'末端を一定塩基長伸長させ、リボヌクレオチド部分を切断し、一定長になった3'末端標識デオキシリボヌクレオチドの生成量から標的ポリヌクレオチドの検出を行うことを特徴とするポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項3】請求項1において、ダイデオキシヌクレオチド三リンが標識体の結合したものであるポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項4】請求項1において、ダイデオキシヌクレオチド三リンがビオチンの結合したもので、一定長になった3'末端ビオチン化デオキシリボヌクレオチドをアビジンあるいはストレプトアビジンを固定した担体を用いて分離する工程を設けたポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項5】請求項2において、核酸プローブがリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成されたもので、デオキシリボヌクレオチドの少なくとも一カ所にビオチンが結合したものを、一定長になったビオチン化デオキシリボヌクレオチドをアビジンあるいはストレプトアビジンを固定した担体を用いて分離する工程を設けたポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項6】請求項1、2、3、4または5において、標識物が蛍光体であるポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項7】請求項3において、核酸プローブの標識物と標識ダイデオキシヌクレオチド三リン酸の標識物がそれぞれ異なる蛍光体で、前記二種の蛍光体はエネルギー移動を起こすものであるポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項8】請求項1、2、3、4、5、6または7において、3'末端のデオキシリボヌクレオチド部分が3ないし7塩基長で、その5'末端側の少なくとも一カ所にリボヌクレオチド部分を持つ構造で、3'末端側に伸長する塩基長が3ないし7塩基長であるポリヌクレオチドの検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はDNAの検出及び遺伝子診断法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】遺伝病やウイルス等による感染症の診断

under coexisting of labelling dideoxy nucleotide 3 phosphoric acid of base kind which differs, fixed base length extension doing the 3' end, detection method of polynucleotide which designates that it detects the target polynucleotide from produced amount of 3' end labelling dioxynucleotide which cuts off ribonucleotide portion, has become the constant length as feature.

[Claim 3] In Claim 1, detection method of polynucleotide which is something which the dideoxy nucleotide three phosphorus connects labelling body.

[Claim 4] In Claim 1, being something which dideoxy nucleotide three phosphorus connects the biotin, detection method of polynucleotide which provides step which separates the 3' end biotinylation dioxynucleotide which has become constant length avidin or making use of the support which locks up pick-up 7 avidin.

[Claim 5] In Claim 2, being something where nucleic acid probe consists ribonucleotide and the dioxynucleotide, detection method of polynucleotide which provides step which separates biotinylation dioxynucleotide which has become constant length making use of those which biotin connects at least to one site of dioxynucleotide, making use of support which locks avidin or pick-up 7 avidin.

[Claim 6] In Claim 1, 2, 3, 4 or 5, detection method of polynucleotide where label is phosphor.

[Claim 7] In Claim 3, with label of nucleic acid probe and phosphor where the label of labelling dideoxy nucleotide 3 phosphoric acid differs respectively, as for phosphor of the aforementioned two kinds detection method of polynucleotide which is something which causes energy movement.

[Claim 8] In Claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, dioxynucleotide portion of 3' end with 3 or 7 base length, with the construction which has ribonucleotide portion at least in one site of 5' terminal side, in the 3' terminal side extension detection method of polynucleotide where base length which is done is 3 or 7 base length.

【Description of the Invention】

【0001】

【Field of Industrial Application】This invention is something regarding detection and gene diagnostic method of the DNA.

【0002】

【Prior Art】Detection of DNA or other polynucleotide is used for

にDNA等のポリヌクレオチドの検出が用いられている。検査対象となるウィルスのコピー数は少ない場合には数十コピー以下であり、ポリメラーゼ チェイン リアクション (PCR; Polymerase Chain Reaction) 法によりDNAを増殖し、検出する方法がネイチャー (Nature) 350, 91-92 (1991) あるいは特開昭61-274697号公報に開示されている。PCR法はDNAの特定の領域を増殖するもので、対象となる二本鎖DNAの(+)鎖及び(-)鎖にハイブリダイズする二種のオリゴマではさまれる領域のDNAを増殖する。

【0003】二本鎖DNAを高温(～90℃)下で変性し、(+)鎖と(-)鎖に分離する。次いで降温(～60℃)し、それぞれにDNAオリゴマをハイブリダイズさせ、Taq由来など耐熱性DNAポリメラーゼで相補鎖を合成する。再び昇温して二対の(+)鎖および(-)鎖を作製する。以下、降温と昇温の熱サイクルを繰り返し、DNA鎖を倍々と増やしていく。実際には1回の熱サイクルで平均1.6倍程度になることが知られており、30回繰り返すと106倍にもコピー数を増やすことが出来る。このようにして得たDNAをゲル電気泳動分離し、増幅されたDNAの長さを調べることにより標的DNAの有無を診断している。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】この方法ではDNAコピーの増殖に高価な耐熱性酵素を必要とすること、昇温と降温を繰り返す手間と時間がかかること、二種のDNA増殖用オリゴマ(プライマ)が必要である難点がある。特に対象によっては2つのプライマをうまく選べないこともある。更に電気泳動によりPCR産物を分離する必要があるため手間と労力を必要とする難点があった。また従来技術では、標的ポリヌクレオチドの特定部位を増幅できるので高感度であるが、検出にRI標識物を用いたりエチジウムブロマイドを用いた蛍光染色法を用いている。これらは用手法であり、自動化に適さない。また、RI標識物を用いる場合は作業者の放射線被曝という問題もあった。

【0005】本発明の目的は、簡便で高感度な標的ポリヌクレオチド即ちDNAの検出法を提供することにある。より具体的には、本発明の目的は標的ポリヌクレオチド試料とハイブリッド体を形成した核酸プローブを一定温度の酵素反応で増幅する手段を提供することにある。また自動化に適した標的ポリヌクレオチドの検出手法を提供することにある。また本発明の他の目的は、核酸プ

r diagnosis of infection due to hereditary disease and virus etc. virus which become inspection object copy number when it is little, is below theseveral ten copy, with polymerase chain reaction (PCR; polymerase chain reaction) method DNA it multiplies, method which is detected Nature (Nature) 350, 91-92 (1991) or is disclosed in Japan Unexamined Patent Publication Showa 61-274697 disclosure. PCR method specific region of DNA being something which multiplies, DNA of region which is put between with oligomer of two kinds which hybridize is done multiplies in (+) chain and the (-) chain of double strand DNA which becomes object.

【0003】 Modified it does double strand DNA under high temperature (to 90 °C), separates into (+) chain and (-) chain. Next cooling (to 60 °C) it does, hybridize does DNA oligomer respectively, synthesizes complementary strand with heat resistance DNA polymerase such as Taq derivation. Again temperature rise doing, it produces (+) chain and (-) chain of the two pair. Below, heat cycle of cooling and temperature rise is repeated, the DNA chain many fold is increased. When actually it is known, 30 time repeats that with heat cycle of one time it becomes even 1.6-fold extent, it is possible to increase the copy number to also 106 time. DNA which it acquires in this way gel electrophoresis is separated, the presence or absence of target DNA diagnosis is done by inspecting length of the DNA which amplifying is done.

【0004】

【Problems to be Solved by the Invention】 Labor and time which with this method needs expensive heat resistance enzyme in multiplication of the DNA copy, repeats temperature rise and cooling catches, there is a difficulty where oligomer (primer) for DNA multiplication of two kinds is necessary. Especially, there are also times when 2 primer cannot be chosen well depending upon object. Furthermore because it is necessary to separate PCR product due to the electrophoresis there was a difficulty which needs labor and labor. In addition because with Prior Art, amplifying is possible specific site of target polynucleotide, it is a high sensitivity, but fluorescence dyeing method which uses RI label for detection and/or uses ethidium bromide is used. These are business technique, it is not suited for automation. In addition, when RI label is used, there was also a problem, radiation radiation sickness of the worker.

【0005】 Objective of this invention, being simple, is to offer detection method of the highly sensitive target polynucleotide namely DNA. more concretely, as for objective of this invention nucleic acid probe which formed target polynucleotide sample and hybrid it is to offer means which the amplifying is done with enzymatic reaction of constant temperature. In addition it is to offer detection technique of target

ローブの非RI標識を実現して、作業者と放射線被爆から開放することと作業場所への制約を無くすことにある。

[0006]

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために本発明では、以下のような手法を用いる。

【0007】まず、次の(1)乃至(3)のいずれかの方法によって核酸プローブを一定温度の酵素反応で増幅する。

【0008】(1) 核酸プローブがリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成されたもので、デオキシリボヌクレオチドの少なくとも一カ所に標識物が結合したものをを用いる。この核酸プローブを標的ポリヌクレオチドにハイブリッド形成条件下で結合させる。次に、少なくとも一種のデオキシリボヌクレオチド3リン酸とデオキシリボヌクレオチド3リン酸とは異なる塩基種のダイデオキシヌクレオチド3リン酸の共存下でリボヌクレアーゼ エイチ (Ribonuclease H) などのRNA分解酵素と核酸合成酵素を反応させることで3'末端を一定塩基長伸長させ、リボヌクレオチド部分を切断する。この一連の伸長分解反応で生成するプローブ産物の塩基長を10塩基程度かそれ以下になる様に元の核酸プローブを設計する。このような短いプローブ産物は標的ポリヌクレオチドとの水素結合を保持出来なくなるため、短くなったプローブ産物は標的ポリヌクレオチドから遊離し、元の標的ポリヌクレオチドを再生する。再生した、標的ポリヌクレオチドは再度核酸プローブと結合し、一連の伸長分解反応が起きる。一定時間反応させる間にこのサイクルを複数回繰り返して行わせる。

【0009】(2) リボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成された核酸プローブを標的ポリヌクレオチドにハイブリッド形成条件下で結合させ、少なくとも一種のデオキシリボヌクレオチド3リン酸と該デオキシリボヌクレオチド3リン酸とは異なる塩基種の標識ダイデオキシヌクレオチド3リン酸共存下でRNA分解酵素と核酸合成酵素を反応させる。この反応で3'末端を一定塩基長伸長させて3'末端に標識すると共に、リボヌクレオチド部分を切断し、一定長の3'末端標識デオキシリボヌクレオチドを生成する。(1)と同様に、この一連の伸長分解反応で生成するプローブ産物の塩基長を10塩基程度かそれ以下になる様に元の核酸プローブを設計し、核酸プローブの伸長分解—短くなったプローブ

polynucleotide which issued for automation. In addition as for other objective of this invention, actualizing non-RI labelling of nucleic acid probe, are times when it opens worker from theradiation radiation sickness and times when restriction to workplace is lost.

[0006]

[Means to Solve the Problems] With this invention, like below technique is used in order to achieve above-mentioned objective.

[0007] First, nucleic acid probe amplifying is done with enzyme reaction of constant temperature with the method of any of next (1) through (3).

[0008] (1) Being something where nucleic acid probe consists ribonucleotide and deoxyribonucleotide, it uses those which label connects at least to one site of the deoxyribonucleotide. This nucleic acid probe is connected to target polynucleotide under hybridization condition. Next, deoxyribonucleotide 3 phosphoric acid and deoxyribonucleotide 3 phosphoric acid of at least one kind under coexisting of the deoxy nucleotide 3 phosphoric acid of base kind which differs ribonuclease H. (Ribonuclease H) or other RNA hydrolase and nucleic acid synthesis enzyme the fixed base length extension doing 3' end by fact that it reacts, it cuts off the ribonucleotide portion. In order base length of probe product which is formed with this consecutive extension hydrolysis reaction to become 10 base extent or less than that, original nucleic acid probe is designed. This kind of short probe product cannot keep hydrogen bond of target polynucleotide and because it becomes, probe product which has become short separates from the target polynucleotide, regeneration does original target polynucleotide. regeneration it did, it connects target polynucleotide with nucleic acid probe for second time, consecutive extension hydrolysis reaction occurs. constant time while reacting, this cycle multiple times repeatedly is done.

[0009] (2) Connecting nucleic acid probe which is formed with ribonucleotide and deoxyribonucleotide to the target polynucleotide under hybridization condition, deoxyribonucleotide 3 phosphoric acid and said deoxyribonucleotide 3 phosphoric acid of at least one kind the RNA hydrolase and nucleic acid synthesis enzyme it reacts under labelling deoxy nucleotide 3 phosphoric acid coexisting of base kind which differs. Fixed base length extension doing 3' end with this reaction, as labelling it does in 3' end, it cuts off ribonucleotide portion, forms 3' end labelling deoxyribonucleotide of the constant length. In order (1) with in same way, base length of probe product which is formed with this consecutive extension hydrolysis reaction to become 10 base

ブ産物の遊離と標的ポリヌクレオチドの再生のサイクルを複数回繰り返し行わせる。

【0010】(3) 核酸プローブがリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成されたもので、該デオキシリボヌクレオチドの少なくとも一カ所に標識物が結合したものをを用いる。標的ポリヌクレオチドに結合させた後、少なくとも一種のデオキシリボヌクレオチド3リン酸と該デオキシリボヌクレオチド3リン酸とは異なる塩基種で標識体の結合したダイデオキシヌクレオチド3リン酸共存下でRNA分解酵素と核酸合成酵素を反応させる。この反応で3'末端を一定塩基長伸長させて3'末端に標識し、リボヌクレオチド部分を切断し、中間塩基部と3'末端が標識された一定長のデオキシリボヌクレオチドを生成する。(1)と同様に、この一連の伸長分解反応で生成するプローブ産物の塩基長を10塩基程度かそれ以下になる様に元の核酸プローブを設計し、核酸プローブの伸長分解一短くなったプローブ産物の遊離と標的ポリヌクレオチドの再生のサイクルを複数回繰り返し行わせることとした。

【0011】次いで、次の(4)または(5)の方法により標的ポリヌクレオチドを検出する。

【0012】(4) 上記(1)において、ダイデオキシヌクレオチド三リンがビオチンの結合したもので、一定長になった3'末端ビオチン化デオキシリボヌクレオチドをアビジンあるいはストレプトアビジンを固定した担体を用いて分離する。

【0013】(5) 上記(2)または(3)において、核酸プローブのデオキシリボヌクレオチド部分の少なくとも一カ所にビオチンが結合したものをを用い、一定長になったビオチン化プローブをアビジンあるいはストレプトアビジンを固定した担体を用いて分離する工程を設けることとした。

【0014】また、次の(6)または(7)の方法により核酸プローブの非RI標識を実現する。

【0015】(6) 上記(1)、(2)、(3)において、標識物に蛍光体を用いる。

【0016】(7) 上記(3)では、核酸プローブのデオキシヌクレオチド部の標識物と標識ダイデオキシヌクレオチド3リン酸の標識物がそれぞれ異なる蛍光体で構成され、前記二種の蛍光体はエネルギー移動を起こすようにし、一方の蛍光体を励起することで他方の蛍光体を間接的に励起する。

extent or less than that, the original nucleic acid probe is designed, extension disassembly of nucleic acid probe cycle of theregeneration of separation and target polynucleotide of probe product which has become short the multiple times repeatedly is done.

[0010] (3) Being something where nucleic acid probe consists ribonucleotide and deoxyribonucleotide, it uses those which label connects at least to one site of the said deoxyribonucleotide. In target polynucleotide after connecting, deoxyribonucleotide 3 phosphoric acid and said deoxyribonucleotide 3 phosphoric acid of at least one kind under dideoxy nucleotide 3 phosphoric acid coexisting which labelling body connects in base kind which differs RNA hydrolase and nucleic acid synthesis enzyme it reacts. Fixed base length extension doing 3' end with this reaction, labelling it does in 3' end, cuts off ribonucleotide portion, intermediate base section and 3' end form the deoxyribonucleotide of constant length which labelling is done. In order (1) with in same way, base length of probe product which is formed with this consecutive extension hydrolysis reaction to become 10 base extent or less than that, the original nucleic acid probe was designed, extension disassembly of nucleic acid probe multiple times repeatedly to do cycle of regeneration of separation and target polynucleotide of the probe product which had become short.

[0011] Next, target polynucleotide is detected with method of next (4) or (5).

[0012] (4) In above-mentioned (1), being something which did coxy nucleotide three phosphorus connects biotin, it separates 3' end biotinylation deoxyribonucleotide which has become constant length making use of support which locks avidin or a pick-up probe for avidin.

[0013] (5) To provide step which separates biotinylation probe which has become the constant length in above-mentioned (2) or (3), making use of those which the biotin connects at least to one site of deoxyribonucleotide portion of nucleic acid probe, making use of support which locks avidin or a pick-up probe for avidin.

[0014] In addition, non-RI labelling of nucleic acid probe is actualized with method of next (6) or (7).

[0015] (6) In above-mentioned (1), (2), (3), phosphor is used for label.

[0016] (7) With above-mentioned (3), it consists label of deoxy nucleotide section of nucleic acid probe and phosphor where label of labelling dideoxy nucleotide 3 phosphoric acid differs respectively, phosphor of aforementioned two kinds tries to cause energy movement, by fact that excitation it does on one hand phosphor phosphor of other in indirect excitation

【0017】

【作用】標的核酸が、一本鎖DNAなどの一本鎖核酸の場合にはそのまま試料とすることができる。また、二本鎖DNAの場合には、熱あるいはアルカリ変性してもよいが、ハイブリッド形成条件下で標的核酸同士のハイブリッド形成が起こり、核酸プローブとのハイブリッド形成効率が低下するので、エキソヌクレアーゼIIIのような二本鎖特異的ヌクレアーゼで処理して一本鎖にしておく方がよい。

【0018】リボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成された核酸プローブは、16塩基長以上のものであれば標的ポリヌクレオチドと結合することが出来る。デオキシリボヌクレオチド3リン酸とダイデオキシヌクレオチド3リン酸の共存下で核酸合成酵素を反応させると、核酸プローブをプライマとして3'末端に塩基を付加することができる。ここでデオキシリボヌクレオチド3リン酸とダイデオキシヌクレオチド3リン酸を別の種類の塩基種にしておけば、最初のダイデオキシヌクレオチド3リン酸結合部位で伸長反応を停止することが出来る。

【0019】核酸合成酵素による伸長反応はダイデオキシヌクレオチド3リン酸結合部位で100%反応が停止するとは限らないので、ダイデオキシヌクレオチド3リン酸結合部位の次の3'側塩基部分に相当するデオキシヌクレオチド3リン酸は加えない方が伸長反応を確実に停止できる。

【0020】核酸合成酵素による伸長反応を行うときにRibonuclease HのようなDNAとRNAのハイブリダイゼーション形成部分のRNA部分を特異的に分解するRNA分解酵素を用いれば、標的ポリヌクレオチドにハイブリダイゼーション条件下で結合した核酸プローブのリボヌクレオチド部分を分解することが出来る。この時、デオキシリボヌクレオチド部分即ち標的ポリヌクレオチドや核酸プローブのデオキシリボヌクレオチド部分や伸長した部分は分解されない。このため、核酸プローブは5'末端側が短くなり、3'末端側が長くなる。

【0021】伸長する長さを2~5塩基とし、分解された核酸プローブの全長を10塩基以下になるようにプローブを設計すれば、このように短いプローブは標的ポリヌクレオチドとの水素結合を保持出来なくなる。このため一連の反応で伸長分解を受けた核酸プローブは標的ポリヌクレオチドから遊離し、元の標的ポリヌクレオチドを再生する。通常、核酸プローブは大過剰存在するので、再生した標的ポリヌクレオチドは再度核酸プローブと

does.

【0017】

[Work or Operations of the Invention] When target nucleic acid, it is a single stranded DNA or other single strand nucleic acid, it can make sample that way. In addition, in case of double strand DNA, heat or alkali modified it is possible to do, but hybridization of target nucleic acid to happen under hybridization condition, because hybridization efficiency of nucleic acid probe decreases, treating with double strand specific nuclease like the exonuclease III, one which it makes single strand is good.

[0018] If nucleic acid probe which is formed with ribonucleotide and deoxyribonucleotide is something above 16 base length, it is possible to connect with target polynucleotide. When nucleic acid synthesis enzyme it reacts under coexisting of deoxyribonucleotide 3 phosphoric acid and dideoxy nucleotide 3 phosphoric acid, the base can be added to 3' end with nucleic acid probe as primer. If here deoxyribonucleotide 3 phosphoric acid and dideoxy nucleotide 3 phosphoric acid are designated as base kind of another types, it is possible to stop elongation reaction with initial dideoxy nucleotide 3 phosphate bond site.

[0019] Because 100% reaction stops elongation reaction due to nucleic acid synthesis enzyme does not limit with dideoxy nucleotide 3 phosphate bond site, as for deoxy nucleotide 3 phosphoric acid which is suitable to following 3' side base portion of dideoxy nucleotide 3 phosphate bond site one which is not added can stop elongation reaction securely.

[0020] When doing elongation reaction due to nucleic acid synthesis enzyme, if RNA hydrolase which disassembles the RNA portion of hybridization forming part of DNA and RNA like Ribonuclease H in the specific is used, it is possible to disassemble ribonucleotide portion of the nucleic acid probe which is connected to target polynucleotide under hybridization condition. This time, deoxyribonucleotide portion and portion which extension of deoxyribonucleotide portion namely the target polynucleotide and nucleic acid probe is done is not disassembled. Because of this, as for nucleic acid probe 5' terminal side becomes short, 3' terminal side becomes long.

[0021] It designates length which extension is done as 2 to 5 base and in order total length of nucleic acid probe which was disassembled to be below the 10 base, if it designs probe, this way short probe cannot keep the hydrogen bond of target polynucleotide and becomes. Because of this nucleic acid probe which receives extension disassembly with consecutive reaction separates from target polynucleotide, regeneration does the original target polynucleotide. Because usually, nucleic acid

結合し、一連の分解伸長反応が起きる。このサイクルは核酸プローブが消費しつくされるまで起きるので、分解伸長した核酸プローブは増幅産生される。

【0022】本発明では、核酸プローブの一部に蛍光体を結合したものをを用いるか、蛍光体の結合したダイデオキシリボヌクレオチドを用いて伸長反応の際の3'末端に蛍光体を導入するので、検出は蛍光検出で行うことができる。蛍光体にはフルオレッセイン、テトラメチルローダミン、ローダミンX、スルホローダミン101等を用いることができる。あるいは、核酸プローブの蛍光体と3'末端に導入される蛍光体の種類を変えておけば両蛍光体間のエネルギー移動を利用できるので、片方の蛍光体を励起して他方の蛍光体の蛍光を検出することが出来る。このような蛍光体の組合せとしてはフルオレッセインとスルホローダミン101等の組合せが有効である。

【0023】標的ポリヌクレオチドに結合して分解伸長した核酸プローブは分解されていないプローブや伸長する前に分解したプローブと塩基長が異なるために電気泳動を用いて容易に分離検出できる。

【0024】ダイデオキシリボヌクレオチド三リンがピオチンの結合したものをを用いて分解伸長反応で3'末端にピオチンを導入したプローブはストレプトアビジン等を固定した担体で容易に捕捉できる。ピオチンが入らなかったプローブ、即ち、3'末端の伸長が起きなかったプローブ等は洗浄して除くことができるので、担体上の蛍光を測定することで分解伸長がおきたプローブ量、即ち、試料中の標的ポリヌクレオチド量を知ることが出来る。同様に、核酸プローブのデオキシリボヌクレオチド部分にピオチンが結合したものをを用いる場合でも、分解伸長反応で3'末端に蛍光体が導入されるケースでは担体上の蛍光強度を測定することで試料中の標的ポリヌクレオチド量を知ることが出来る。

【0025】

【実施例】

(実施例1) 核酸プローブを一定温度の酵素反応で増幅する本発明について説明する。本発明でのDNAプローブの構造を図1に記した。図中の標識体にはスルホローダミン101蛍光体を用いたが、他の蛍光色素でも可能である。

probe exists large excess, it connects the target polynucleotide which regeneration is done with nucleic acid probe for second time, the consecutive disassembly elongation reaction occurs. nucleic acid probe to consume this cycle, until it is exhausted, because it occurs, nucleic acid probe which disassembly extension is done is produced the amplifying.

[0022] With this invention, those which connect phosphor to portion of nucleic acid probe are used or, making use of dideoxy ribonucleotide which phosphor connects case of elongation reaction because phosphor is introduced into 3' end, as for detection it is possible to do in fluorescence detection. Is possible fact that fluorescein, tetramethyl rhodamine, rhodamine X, sulfo rhodamine 101 etc is used to phosphor. Or, if phosphor of nucleic acid probe and types of phosphor which is introduced into 3' end are changed, because energy movement between both phosphor can be utilized, excitation doing phosphor of one side, it is possible to detect fluorescence of phosphor of other. fluorescein and sulfo rhodamine 101 or other combination are effective as combination of this kind of phosphor.

[0023] Connecting to target polynucleotide, probe and extension in which are not disassembled before doing, easily it can separate can detect nucleic acid probe which disassembly extension it does because probe and base length which it disassembled differ making use of electrophoresis.

[0024] Probe which introduces biotin into 3' end with the disassembly elongation reaction making use of those which dideoxy nucleotide three phosphorus connects biotin gripping is possible easily with support which locks pick-up 7 avidin etc. probe where biotin does not enter, namely, washing probe etc where extension of 3' end did not occur, because it can exclude, probe quantity where disassembly extension occurred by the fact that it measures fluorescence on support, namely, it can know the target polynucleotide quantity in sample. In same way, even with when those which biotin connects to the dideoxy ribonucleotide portion of nucleic acid probe are used, with case where phosphor is introduced into 3' end with disassembly elongation reaction it can know the target polynucleotide quantity in sample by fact that fluorescence intensity on support is measured.

[0025]

[Working Example(s)]

(Working Example 1) You explain nucleic acid probe concerning this invention which amplifying is done with enzymatic reaction of constant temperature. construction of DNA probe with this invention was inscribed to Figure 1. sulfo rhodamine 101 phosphor was used to labelling body of in the diagram, but it is possible even with other fluorochrome.

【0026】各プローブの基本的な動作を図2ないし図4を用いて説明する。第1の例は図2に示す様に、試料に一本鎖DNA 101とこれに相補的な塩基配列を持つ図1(a)に記載の核酸プローブ1を用いる。核酸プローブ1は5'末端に10塩基長のデオキシリボヌクレオチド部分11があり、その3'側に8塩基長のリボヌクレオチド12が続き、5'末端側が6塩基長のデオキシリボヌクレオチド部分13からなる全長24塩基長のハイブリッドオリゴヌクレオチドである。デオキシリボヌクレオチド部分13の5'から4番目の塩基にはスルホローダミン101蛍光体が結合している。

【0027】図2のように、試料DNA 101と核酸プローブ1を37℃で混合すると両者は相補的な配列を持っているためにハイブリダイズし、102のような複合体を形成する。ここで、二種のデオキシリボヌクレオチド三磷酸103、104とダイデオキシリボヌクレオチド三磷酸105とDNAポリメラーゼであるシーケネース(東洋紡績株式会社製)107とRNA分解酵素であるRNase H(宝酒造株式会社製)106を共存させておく。

【0028】試料DNA 101に結合した核酸プローブ1の3'末端にはシーケネースによりデオキシリボヌクレオチド三磷酸が3塩基長分伸長した後、ダイデオキシリボヌクレオチド三磷酸が結合し反応が停止する。また、試料DNA 101に結合した核酸プローブ1のリボヌクレオチド部分はRNase Hにより分解される。伸長と分解を受けたプローブは約10塩基長になる。ここで、伸長反応が起きる前にRNase Hによる分解を受けた核酸プローブは6塩基長になるので試料DNA 101から遊離してしまうので、その後の伸長反応は起きない。このように伸長反応が起きずに分解を受けたものは6塩基長で、伸長反応を受けた後に分解したフラグメント108は10塩基長であるので両者は電気泳動的に分離することが出来る。

【0029】伸長反応と分解を受けて10塩基長になったフラグメント108は37℃では試料DNA 101から遊離し、元の試料DNA 101を再生する。再生した試料DNA 101は、再度、核酸プローブ1と結合し、伸長分解の一連のサイクルを繰り返す。

【0030】実際に、 1×10^{-18} molの標的DNA 101と 1×10^{-13} molの核酸プローブ1をデオキシリボヌクレオチド三磷酸であるdTとdCとダイデオキシリボヌクレオチド三磷酸ddG共存下で1ユニットのシーケネースと1ユニットのRNase Hを37℃30分間反応さ

[0026] Fundamental operation of each probe is explained making use of Figure 2 through Figure 4. first example as shown in Figure 2, single stranded DNA 101 uses nucleic acid probe 1 which is stated in Figure 1 (a) which has complementary base sequence in this for sample. nucleic acid probe 1 is a dioxynucleotide portion 11 of 10 base length in 5' end, ribonucleotide 12 of 8 base length follows 3' side, it is a hybrid oligonucleotide of total length 24 base length where 5' terminal side consists of dioxynucleotide portion 13 of 6 base length. sulfo rhodamine 101 phosphor has connected to base of 4th from 5' of the dioxynucleotide portion 13.

[0027] Like Figure 2, when sample DNA 101 and nucleic acid probe 1 are mixed with 37 °C, the hybridize it does both because it has complementary sequence, it forms the composite like 102. Here, RNase H (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) KK make) 106 which is a C. Kenney (Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160) make) 107 and aRNA hydrolase which are a dioxynucleotide triphosphoric acid 103, 104 and a dideoxy ribonucleotide triphosphoric acid 105 and a DNA polymerase of two kinds it coexists.

[0028] With C. Kenney's dioxynucleotide triphosphoric acid 3 base length amount extension after doing, the dideoxy ribonucleotide triphosphoric acid connects to 3' end of nucleic acid probe 1 which is connected to the sample DNA 101 and reaction stops. In addition, ribonucleotide portion of nucleic acid probe 1 which is connected to sample DNA 101 is disassembled by RNase H. probe which receives extension and disassembly becomes approximately 10 base length. Because here, before elongation reaction occurs, because nucleic acid probe which receives disassembly with RNase H becomes 6 base length it separates from sample DNA 101, after that elongation reaction does not occur. This way elongation reaction without occurring, because as for those which receive disassembly with 6 base length, after receiving elongation reaction, as for the fragment 108 which was disassembled it is a 10 base length to separate into the electrophoretic it is possible both.

[0029] Receiving elongation reaction and disassembly, fragment 108 which has become the 10 base length with 37 °C separates from sample DNA 101, regeneration does the original sample DNA 101. For second time, it connects sample DNA 101 which regeneration is done, with nucleic acid probe 1, repeats consecutive cycle of extension disassembly.

[0030] Actually, target DNA 101 of 1×10^{-18} mol and nucleic acid probe 1 of 1×10^{-13} mol C. Kenney's of 1 unit and RNase H of 1 unit 37 °C 30-minute it reacted under dT and dC and dideoxy ribonucleotide triphosphoric acid ddG coexistence which are a dioxynucleotide triphosphoric acid. 95 °C 2

せた。反応液を95℃2分間加熱し、反応を停止した後、電気泳動で分離分析した。電気泳動には日立WSQ-3000型DANシーケンサの励起用レーザをHe/Neレーザ(633nm)に変え、更に、集光効率を上げるために電気泳動版にシリンドリカルレンズを貼付て高感度検出できるように改造して用いた。

【0031】その結果、伸長反応を受けた後に分解したフラグメントが未反応のプロブや伸長反応を受ける前に分解されたフラグメントと分離して検出できた。検出された全ての蛍光ピークの強度総和と伸長反応を受けた後に分解したフラグメントのピークの強度の比から伸長反応を受けた後に分解したフラグメント量を計算したところ、標的DNAに対し約200倍のフラグメントが生成していた。このことから本実施例を用いれば、一定温度の酵素反応で核酸プロブの増幅を起こすことができることが確認された。

【0032】本実施例では核酸プロブに図1の(a)の構造のものを用いたが、図1の(d)のように、リボヌクレオチド43が複数部位ある核酸プロブ4でも、同様な結果を得ることが出来る。

【0033】(実施例2)本実施例では図1(b)に記載の核酸プロブ2を用いる。核酸プロブ2は5'末端に10塩基長のデオキシリボヌクレオチド部分21があり、その3'側に8塩基長のリボヌクレオチド22が続き、5'末端側に6塩基長のデオキシリボヌクレオチド部分23からなる全長24塩基長のハイブリッドオリゴヌクレオチドである。蛍光体は結合していない。

【0034】図3のように、試料DNA101と核酸プロブ1を37℃で混合すると両者は相補的な配列を持っているためにハイブリダイズし、202のような複合体を形成する。ここで、二種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸103、104と蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチド三リン酸205とDNAポリメラーゼであるシーケネース(東洋紡績株式会社製)107とRNA分解酵素であるRNase H(宝酒造株式会社製)106を共存させておく。蛍光標識にはスルホローダミン101蛍光体を用いた。試料DNA101に結合した核酸プロブ2の3'末端にはシーケネースによりデオキシリボヌクレオチド三リン酸が3塩基長分伸長した後、蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチド三リン酸205が結合し、反応が停止する。また、試料DNA101に結合した核酸プロブ2のリボヌクレオチド部分22はRNase Hにより分解される。

【0035】伸長と分解を受けたプロブは約10塩基

min it heated reaction mixture, after stopping reaction, it separated it analyzed with electrophoresis. It changed laser for excitation of Hitachi WSQ-3000 type DAN sequencer into the He/Ne laser (633 nm) in electrophoresis, as furthermore, in order to increase light collection efficiency sticking 7 high sensitivity been able to detect cylindrical lens in electrophoresis edition, remodelling, it used.

【0031】As a result, after receiving elongation reaction, before fragment which was disassembled receives unreacted probe and elongation reaction separating with the fragment which was disassembled, it could detect. intensity sum of all fluorescence peak which is detected and after receiving the elongation reaction, after receiving elongation reaction from ratio of intensity of peak of fragment which was disassembled when fragment quantity which was disassembled was calculated, fragment of approximately 200 time had formed vis-a-vis target DNA. If this working example is used from this, what can cause amplifying of the nucleic acid probe with enzyme reaction of constant temperature was verified.

【0032】With this working example those of construction of (a) of Figure 1 were used for the nucleic acid probe, but like (d) of Figure 1, similar result can be acquired even with nucleic acid probe 4 where ribonucleotide 43 is a multiple parts rank.

【0033】(Working Example 2) With this working example nucleic acid probe 2 which is stated in Figure 1 (b) is used. nucleic acid probe 2 is a dioxynucleotide portion 21 of 10 base length in 5' end, ribonucleotide 22 of 8 base length follows 3' side, it is a hybrid oligonucleotide of total length 24 base length where 5' terminal side consists of dioxynucleotide portion 23 of 6 base length. It does not connect phosphor.

【0034】Like Figure 3, when sample DNA 101 and nucleic acid probe 1 are mixed with 37 °C, the hybridize it does both because it has complementary sequence, it forms the composite like 202. Here, RNase H (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) KK make) 106 which is a C. Kenney ス (Toyobo Co. Ltd. (DB 69-053-8160) make) 107 and a RNA hydrolase which are a dioxynucleotide triphosphoric acid 103, 104 and a fluorescent label dideoxy ribonucleotide triphosphoric acid 205 and a DNA polymerase of two kinds it coexists. sulfo rhodamine 101 phosphor was used to fluorescent label. With C. Kenney ス dioxynucleotide triphosphoric acid 3 base length amount extension after doing the fluorescent label dideoxy ribonucleotide triphosphoric acid 205 connects to 3' end of nucleic acid probe 2 which is connected to the sample DNA 101, reaction stops. In addition, ribonucleotide portion 22 of nucleic acid probe 2 which is connected to sample DNA 101 is disassembled by RNase H.

【0035】Probe which receives extension and disassembly become

長になる。実施例 1 と同様に、伸長と分解を受けたプローブ 208 は試料 DNA 101 から遊離して元の試料 DNA 101 を再生する。再生した試料 DNA 101 は再度核酸プローブ 2 と結合し、伸長分解の一連のサイクルを繰り返す。

【0036】実施例 1 と同様に、 1×10^{-18} mol の標的 DNA 101 と 1×10^{-13} mol の核酸プローブ 2 をデオキシリボヌクレオチド三リン酸である dT と dC と蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチド三リン酸 ddG 共存下で 1 ユニットのシーケンスと 1 ユニットの RNase H を 37°C 30 分間反応させた。反応液を 95°C で 2 分間加熱し、反応を停止した後、後の電気泳動分析の妨害にならない程度にゲル濾過を行い、未反応の蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチド三リン酸を大まかに取り除く。続いて電気泳動で分離分析した。

【0037】その結果、実施例 1 と同様に、伸長反応を受けた後に分解したフラグメントが未反応のプローブや伸長反応を受ける前に分解されたフラグメントと分離して検出できた。本実施例では一連の反応で 3' 末端に蛍光体を取り込まれたものを検出することで、標的ポリヌクレオチドに対する選択性を上げる効果がある。

【0038】本実施例では、核酸プローブ 2 を用いたが、図 1 (c) の核酸プローブ 3 のように、ビオチン 34 が結合したものをを用いることもできる。

【0039】この場合、上記手法と同様の操作で、3' 末端にデオキシリボヌクレオチド三リン酸を 3 塩基長分伸長した後、蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチド三リン酸を結合させる。同時に RNase H でリボヌクレオチド部分 32 を分解し、分解伸長フラグメントを得る。

【0040】続いて、反応液を電気泳動で分離し、電気泳動担体ゲルから溶出してくる分解伸長フラグメントを含むフラクションをストレプトアジピンを固定したマイクロプレートに分集する。

【0041】この操作で、ビオチンの結合したフラグメントはマイクロプレートに結合する。この時点で、電気泳動で分離不十分のために残されている未反応の蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチドは分離除去される。マイクロプレート表面に結合した蛍光体由来の蛍光を測定することで、上記実施例 1 と同様の結果を得ることができた。

sapproximately 10 base length. In same way as Working Example 1, separating from sample DNA 101, original sample DNA 101 theregeneration it does probe 208 which receives extension and disassembly. It connects sample DNA 101 which regeneration is done with nucleic acid probe 2 for thesecond time, repeats consecutive cycle of extension disassembly.

[0036] In same way as Working Example 1, target DNA 101 of 1×10^{-18} mol and nucleic acid probe 2 of the 1×10^{-13} mol C. Kenney S of 1 unit and RNase H of 1 unit the 37°C 30-minute it reacted under dT and dC and fluorescent label dideoxy ribonucleotide triphosphoric acid ddG coexistence which are a dideoxyribonucleotide triphosphoric acid. reaction mixture 2 min is heated with 95°C , after stopping reaction, the gel filtration is done in extent which does not become bogging of electrophoresis analysis after, unreacted fluorescent label dideoxy ribonucleotide triphosphoric acid is removed roughly. Consequently it separated analyzed with electrophoresis.

[0037] As a result, in same way as Working Example 1, after receiving elongation reaction, before fragment which was disassembled receives unreacted probe and the elongation reaction separating with fragment which was disassembled, it could detect. With this working example by fact that those where phosphor is taken in to the 3' end with consecutive reaction are detected, there is an effect which increases selectivity for target polynucleotide.

[0038] With this working example, nucleic acid probe 2 was used, but like nucleic acid probe 3 of Figure 1 (c), it is possible also to use those which biotin 34 connects.

[0039] In this case, with operation of being similar to the above-mentioned technique, dideoxyribonucleotide 3 phosphoric acid 3 base length amount extension after doing the fluorescent label dideoxy ribonucleotide 3 phosphoric acid is connected to 3' end. ribonucleotide portion 32 is disassembled simultaneously with RNase H, the disassembly extension fragment is obtained.

[0040] Consequently, reaction mixture is separated with electrophoresis, fraction which includes disassembly decompression fragment which is liquated from electrophoresis support gel recentralization is done in microplate which locks pick-up 7 adipic acid.

[0041] With this operation, it connects fragment which biotin connects to the microplate. With this time point, unreacted fluorescent label dideoxy ribonucleotide which from electrophoresis remains because of separation insufficient makes separation and removal. By fact that fluorescence of phosphor derivation which is connected to microplate surface is measured, result which is similar to the above-mentioned Working Example 1 could be acquired.

【0042】（実施例3）本実施例ではスルホローダミン101を蛍光標識した核酸プローブ1とスルホローダミン101を結合した蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチド三リン酸を用いてエネルギー移動で標的ポリヌクレオチドを検出する例について述べる。

【0043】実施例1及び2と同様に図4のように、試料DNA101と核酸プローブ1をハイブリダイズさせ、102のような複合体を形成する。一連の反応で3'末端は3塩基長分伸長した後、蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチド三リン酸が結合し反応が停止する。また、核酸プローブのリボヌクレオチド部分はRNase Hにより分解される。伸長と分解を受けたプローブは約10塩基長になり、二種の蛍光体の結合した伸長と分解を受けたプローブ208が得られる。実施例1と同様に、伸長と分解を受けたプローブは試料DNAから遊離して元の試料DNA101を再生する。再生した試料DNAは、再度、核酸プローブと結合し、伸長分解の一連のサイクルを繰り返す。

【0044】実施例1と同様に、 1×10^{-18} molの標的DNA101と 1×10^{-13} molの核酸プローブ1をデオキシリボヌクレオチド三リン酸であるdTとdCと蛍光標識ダイデオキシリボヌクレオチド三リン酸ddG共存下で1ユニットのシーケネースと1ユニットのRNase Hを37°C 30分間反応させた。反応液を95°C 2分間加熱し反応を停止した後、電気泳動で分離分析した。電気泳動には日立WSQ-3000型DANシーケンサを用いた。レーザは488 nmのアルゴンレーザを用いた。検出には605 nmないし640 nmのバンドパスフィルタを用いてスルホローダミン101由来の蛍光を検出した。

【0045】その結果、伸長反応を受けた後に分解したフラグメントが未反応のプローブや伸長反応を受ける前に分解されたフラグメントと分離して検出できた。蛍光強度より増幅した分解伸長フラグメント量を求めると標的DNAに対し約100倍の分解伸長フラグメントが増幅して得られることがわかった。

【0046】本実施例では二種の蛍光体を取り込まれたフラグメントをエネルギー移動を用いて検出するので、反応生成物以外の電気泳動分離ピークの影響を抑えることができるので、実施例2のような反応後のゲル濾過がいらなくなり、より検出が容易になる利点がある。

[0042] (Working Example 3) You express concerning example which detects target polynucleotide with energymovement with this working example making use of fluorescent label dideoxy ribonucleotide triphosphoric acid which connects thenucleic acid probe 1 and sulfo rhodamine 101 which sulfo rhodamine 101 fluorescent label are done.

[0043] In same way as Working Example 1 and 2 like Figure 4, hybridize doing sample DNA 101 and nucleic acid probe 1, it forms composite like 102. 3 base length amount extension after doing, fluorescent label dideoxy ribonucleotide triphosphoric acid connects 3' end with consecutive reaction and reaction stops. In addition, ribonucleotide portion of nucleic acid probe is disassembled by RNase H. probe which receives extension and disassembly becomes approximately 10 base length, probe 208 which receives extension and the disassembly which phosphor of two kinds connects is acquired. In same way as Working Example 1, separating from sample DNA, original sample DNA 101 theregeneration it does probe which receives extension and disassembly. For second time, it connects sample DNA which regeneration is done, with nucleic acid probe, repeats consecutive cycle of extension disassembly.

[0044] In same way as Working Example 1, target DNA 101 of 1×10^{-18} mol and nucleic acid probe 1 of the 1×10^{-13} mol C. Kenney's of 1 unit and RNase H of 1 unit the 37°C 30-minute it reacted under dT and dC and fluorescent label dideoxy ribonucleotide triphosphoric acid ddG coexistence which are a dideoxyribonucleotide triphosphoric acid. 95°C 2 min it heated reaction mixture and after stopping reaction, it separated it analyzed with electrophoresis. Hitachi WSQ-3000 type DAN sequencer was used to electrophoresis. laser used argon laser of 488 nm. Making use of bandpass filter of 605 nm or 640 nm fluorescence of sulfo rhodamine 101 derivation was detected in detection.

[0045] As a result, after receiving elongation reaction, before fragment which was disassembled receives unreacted probe and elongation reaction separating with the fragment which was disassembled, it could detect. When disassembly extension fragment quantity which amplifying is done is sought from fluorescence intensity, disassembly extension fragment of approximately 100 times amplifying doing vis-a-vis target DNA, it understood that it is acquired.

[0046] Because with this working example fragment where phosphor of two kinds is taken in because is detected making use of energy movement, it can hold down the influence of electrophoresis separation peak other than reaction product, the gel filtration after reacting like Working Example 2 stops needing, compared to a benefit where detection becomes easy is.

【0047】(実施例4) 図5に示すように、ビオチン結合ダイデオキシリボヌクレオチド三リン酸408を用いて蛍光標識プローブ1を他の実施例と同様な反応を行い分解伸長し、3'末端にビオチンを導入した分解伸長フラグメント418を得る。反応液をストレプトアビジン410の結合したマイクロプレート411に移し、30分間攪拌する。この工程で、ビオチンを導入した分解伸長フラグメント409がマイクロプレート表面に捕捉される。十分洗浄した後に、マイクロプレート表面に結合した蛍光体由来の蛍光を測定する。この方法を用いても他の実施例と同様に 1×10^{-18} molの標的DNAを測定できた。検出された蛍光強度から標的DNAに対し約80倍の分解伸長フラグメントが増幅して得られることがわかった。

【0048】

【発明の効果】極微量存在する標的DNAを検出する核酸プローブがリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドで構成されたものを用い、デオキシリボヌクレオチド3リン酸とデオキシリボヌクレオチド3リン酸とは異なる塩基種のダイデオキシヌクレオチド3リン酸共存下でRNA分解酵素と核酸合成酵素を反応させることで3'末端を一定塩基長伸長させ、リボヌクレオチド部分を切断する方法を用いれば、一連の反応で生成した分解伸長フラグメントとして増幅できる。この反応は、一定の温度で行える利点がある。標的DNAを分解伸長フラグメントとして増幅できるので、標的DNAを高感度に検出できる。

【0049】また、核酸プローブ内とダイデオキシヌクレオチド3リン酸で伸長した末端に蛍光体を導入する方法を組み合わせることで、種類の違う二種の蛍光体を導入し、エネルギー移動を用いて検出することで、より容易に分解伸長したフラグメントを検出できる。また、ビオチン化ダイデオキシヌクレオチド3リン酸を用いてプローブの3'末端にビオチンを導入することで、未反応プローブ等を容易に除ける方法を用いることでより装置化に適した方法にすることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】核酸プローブの説明図。

【図2】本発明の反応の一実施例の説明図。

[0047] (Working Example 4) As shown in Figure 5, making use of biotin connection dideoxy ribonucleotide triphosphoric acid 408 the fluorescently labeled probe 1 it does reaction which is similar to other Working Example and the disassembly extension does, it obtains disassembly extension fragment 418 which introduces biotin into 3' end. It moves to microplate 411 to which streptavidin 410 connects the reaction mixture, 30 min agitates. With this step, disassembly extension fragment 409 which introduces biotin the trapping is done in microplate surface. fully after washing, fluorescence of phosphor derivation which is connected to microplate surface is measured. target DNA of 1×10^{-18} mol could be measured in same way as other Working Example making use of this method. Disassembly extension fragment of approximately 80 times amplifying doing from the fluorescence intensity which is detected vis-a-vis target DNA, it understood that it is acquired.

[0048]

[Effects of the Invention] Amplifying is possible under dideoxy nucleotide 3 phosphoric acid coexisting of base kind which differs as disassembly extension fragment which it forms with consecutive reaction extremely minute amount making use of those where nucleic acid probe which detects the target DNA which exists consists ribonucleotide and dioxynucleotide, dioxynucleotide 3 phosphoric acid and the dioxynucleotide 3 phosphoric acid RNA hydrolase and nucleic acid synthesis enzyme fixed base length extension doing 3' end by the fact that it reacts, if it uses method which cuts off the ribonucleotide portion. As for this reaction, there is a benefit which can be done with the fixed temperature. Because amplifying it is possible with target DNA as disassembly extension fragment, target DNA can be detected in high sensitivity.

[0049] In addition, with thing, phosphor of two kinds where types is different can be introduced combining method which introduces the phosphor into end which extension is done inside nucleic acid probe and with the dideoxy nucleotide 3 phosphoric acid, by fact that it detects making use of energy movement, compared to easily fragment which disassembly extension is done can be detected. In addition, by fact that biotin is introduced into 3' end of probe making use of biotinylation dideoxy nucleotide 3 phosphoric acid, by from fact that method which can exclude unreacted probe etc easily is used it can make method which is suited for equipment conversion.

[Brief Explanation of the Drawing(s)]

[Figure 1] Explanatory diagram of nucleic acid probe.

[Figure 2] Explanatory diagram of one Working Example of re

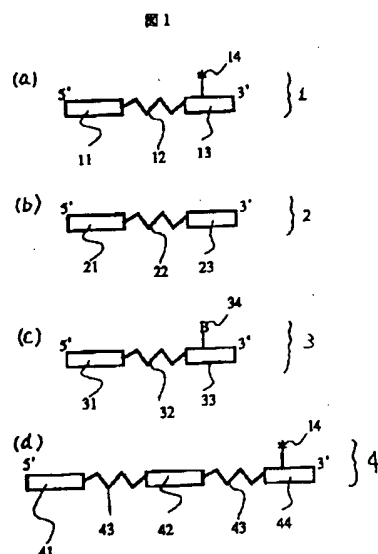
【図 3】 本発明の反応の第二の実施例の説明図。

【図 4】 本発明の反応の第三の実施例の説明図。

【図 5】 本発明の反応の第四の実施例の説明図。

【符号の説明】 11, 13, 21, 23, 31, 33, 41, 42, 44...デオキシリボヌクレオチド部分、12, 22, 32, 43...リボヌクレオチド部分、14...蛍光体、34...ビオチン。

【図 1】



action of this invention.

[Figure 3] Explanatory diagram of second Working Example of reaction of this invention.

[Figure 4] Explanatory diagram of third Working Example of reaction of this invention.

[Figure 5] Explanatory diagram of Working Example of fourth of reaction of this invention.

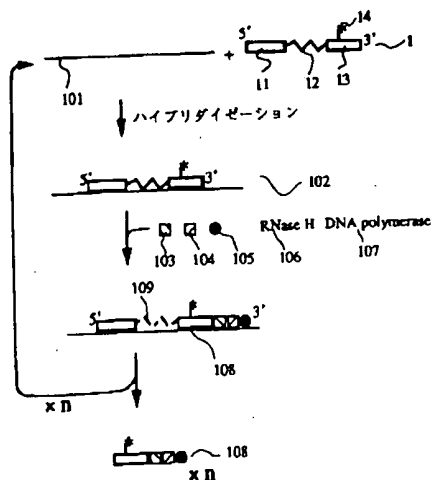
[Explanation of Reference Signs in Drawings] 11,13,21,23, 31, 33,41,42,44... dioxynucleotide portion, 12,22,32,43... ribonucleotide portion, 14... phosphor and 34... biotin.

[Figure 1]

【図 2】

[Figure 2]

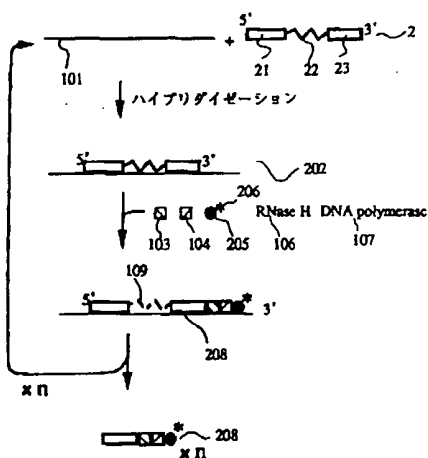
図 2



【図 3】

[Figure 3]

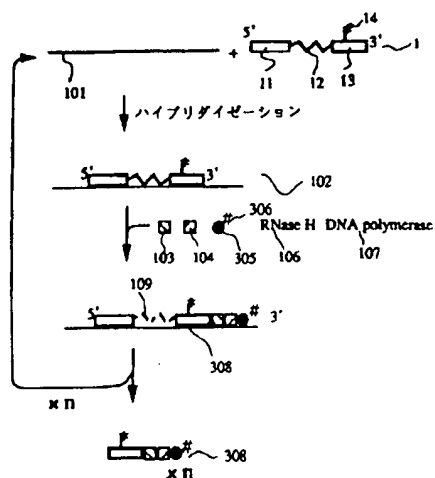
図 3



【図 4】

[Figure 4]

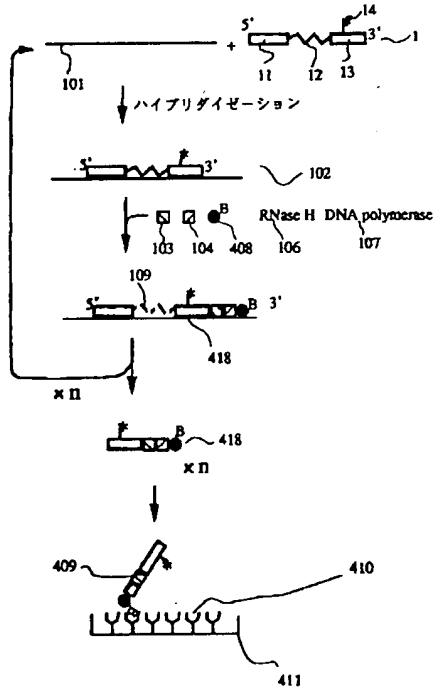
図 4



【図 5】

[Figure 5]

図 5



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.